

## Scanning microscope and module for a scanning microscope

**Publication number:** DE10105391

**Publication date:** 2002-08-29

**Inventor:** HOFFMANN JUERGEN (DE)

**Applicant:** LEICA MICROSYSTEMS (DE)

**Classification:**

**- international:** G02B21/06; G02B21/00; G02B21/16; G02B21/06;  
G02B21/00; G02B21/16; (IPC1-7): G02B21/06

**- European:** G02B21/00M4A3; G02B21/00M4A7R; G02B21/16;  
Y01N8/00

**Application number:** DE20011005391 20010206

**Priority number(s):** DE20011005391 20010206

**Also published as:**



US6958470 (B2)



US2002104961 (A1)



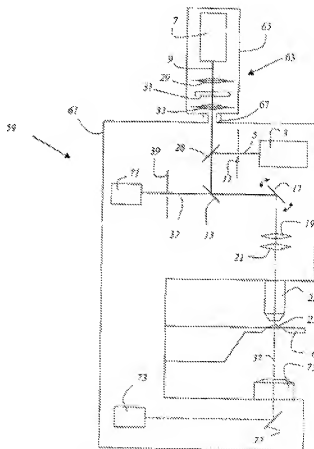
JP2002287035 (A)

Report a data error here

Abstract not available for DE10105391

Abstract of corresponding document: **US2002104961**

The invention discloses a scanning microscope for optical measurement with high spatial resolution of a specimen point of a specimen, having a light source for emitting an exciting light beam suitable for exciting an energy state of the specimen; a detector for detection of the emitted light; and a stimulating light beam, coming from the light source, for generating stimulated emission of the specimen excited by the exciting light beam at the specimen point, the exciting light beam and the stimulating light beam being arranged in such a way that their intensity distributions in the focal region partially overlap, wherein optical elements which shape the stimulating light beam are combined into at least one module that is positionable in the beam path of the scanning microscope.



Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



19 **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT**

22 **Offenlegungsschrift**  
30 **DE 101 05 391 A 1**

51 Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**G 02 B 21/06**

21 Aktenzeichen: 101 05 391.6  
22 Anmeldetag: 6. 2. 2001  
30 Offenlegungstag: 29. 8. 2002

**DE 101 05 391 A 1**

71 Anmelder:  
Leica Microsystems Heidelberg GmbH, 68165  
Mannheim, DE

72 Erfinder:  
Hoffmann, Jürgen, Dr., 65191 Wiesbaden, DE

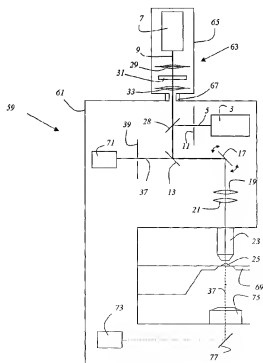
59 Entgegenhaltungen:  
DE 199 14 049 A1  
DE 196 33 185 A1  
WO 95 21 393 A1

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 **Scanmikroskop und Modul für ein Scanmikroskop**

57 Die Erfindung offenbart ein Scanmikroskop zum optischen Messen eines Probenpunktes einer Probe (25) mit hoher Ortsauflösung mit einer Lichtquelle (1) zum Ausenden eines zum Anregen eines Energiezustandes der Probe (25) geeigneten Anregungslichtstrahls (5), einem Detektor (41, 71, 73) zum Nachweis des Emissionslichts und einen von der Lichtquelle kommenden Stimulationslichtstrahl (9) zum Erzeugen stimulierter Emission der von dem Anregungslichtstrahl (5) angeregten Probe (25) in dem Probenpunkt, wobei der Anregungslichtstrahl (5) und der Stimulationslichtstrahl (9) derart angeordnet sind, daß sich ihre Intensitätsverteilungen im Fokalebereich teilweise decken, daß dadurch gekennzeichnet, dass den Stimulationslichtstrahl (9) formende optische Elemente zu mindestens einem Modul (27, 43, 63) zusammengefaßt sind, das im Strahlengang des Scanmikroskops positionierbar ist.



**DE 101 05 391 A 1**

[0001] Die Erfindung betrifft ein Scannmikroskop und ein Modul für ein Scannmikroskop. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Scannmikroskop und ein Modul für ein Scannmikroskop mit den Merkmalen des Oberbegriffs des Anspruchs 1 bzw. 11.

[0002] In der Scannmikroskopie wird eine Probe mit einem Lichtstrahl beleuchtet, um das von der Probe emittierte Reflexions- oder Fluoreszenzlicht zu beobachten. Der Fokus des Beleuchtungslichtstrahles wird mit Hilfe einer steuerbaren Strahlableitvorrichtung, im Allgemeinen durch Verkippen zweier Spiegel, in einer Objektebene bewegt, wobei die Ablenkachsen meist senkrecht aufeinander stehen, so daß ein Spiegel in x- und der andere in y-Richtung ablenkt. Die Verkipfung der Spiegel wird beispielsweise mit Hilfe von Galvanometer-Stellelementen bewerkstelligt. Die Leistung des vom Objekt kommenden Lichtes wird in Abhängigkeit von der Position des Abtaststrahles gemessen. Üblicherweise werden die Stellelemente mit Sensoren zur Ermittlung der aktuellen Spiegelstellung ausgerüstet. Neben diesen sogenannten strahlenscannenden Methoden sind auch Scannmikroskope mit räumlich feststehendem Beleuchtungslichtstrahl bekannt, bei denen die Probe zur Abtastung mit Hilfe eines Feinpositioniermechanismus verfahren wird. Diese Scannmikroskope werden objektscannend genannt.

[0003] Speziell in der konfokalen Scannmikroskopie wird ein Objekt mit dem Fokus eines Lichtstrahles in drei Dimensionen abgetastet.

[0004] Ein konfokales Rastermikroskop umfasst im allgemeinen eine Lichtquelle, eine Fokussieroptik, mit der das Licht der Quelle auf eine Lochblende – die sog. Anregungsblende – fokussiert wird, einen Strahlteiler, eine Strahlableitvorrichtung zur Strahlsteuerung, eine Mikroskopoptik, eine Detektionsblende und die Detektoren zum Nachweis des Detektions- bzw. Fluoreszenzlichtes. Das Beleuchtungslicht wird über einen Strahlteiler eingekoppelt. Das vom Objekt kommende Fluoreszenz- oder Reflexionslicht gelangt über die Strahlableitvorrichtung zurück zum Strahlteiler, passiert diesen, um anschließend auf die Detektionsblende fokussiert zu werden, hinter der sich die Detektoren befinden. Detektionslicht, das nicht direkt aus der Fokusregion stammt, nimmt einen anderen Lichtweg und passiert die Detektionsblende nicht, so daß man eine Punktinformation erhält, die durch sequentielles Abtasten des Objekts zu einem dreidimensionalen Bild führt. Meist wird ein dreidimensionales Bild durch schichtweise Bildkapturen erzielt.

[0005] Die Leistung des vom Objekt kommenden Lichtes wird in festen Zeitabständen während des Abtastvorganges gemessen und so Rasterpunkt für Rasterpunkt abgetastet. Der Messwert muss eindeutig der dazugehörigen Scanposition zugeordnet sein, um aus den Messdaten ein Bild erzeugen zu können. Zweckmäßiger Weise werden hierfür die Zustandsdaten der Verstellelemente der Strahlableitvorrichtung laufend mitgemessen oder, was allerdings weniger genau ist, direkt die Steuersollaten der Strahlableitvorrichtung verwendet.

[0006] Es ist auch möglich in einer Durchlichtanordnung beispielsweise das Fluoreszenzlicht oder die Transmission des Anregungslichtes kondensorseitig zu detektieren. Der Detektionslichtstrahl gelangt dann nicht über die Scanspiegel zum Detektor (Non-Descan-Anordnung). Für die Detektion des Fluoreszenzlichtes wäre in der Durchlichtanordnung eine kondensorseitige Detektionsblende nötig, um, wie in der beschriebenen Descan-Anordnung, eine dreidimensionale Auflösung zu erzielen. Im Falle der Zweiphotonenanregung kann jedoch auf eine kondensorseitige Detektionsblende verzichtet werden, da die Anregungswahrscheinlich-

keit vom Quadrat der Photondichte abhängt (proportional der Intensität<sup>2</sup>), die naturgemäß im Fokus viel höher ist als in den Nachbarregionen. Das zu detektierende Fluoreszenzlicht stammt daher mit großer Wahrscheinlichkeit zum aller größten Teil aus der Fokusregion, was eine weitere Differenzierung von Fluoreszenzphotonen aus dem Fokusbereich von Fluoreszenzphotonen aus den Nachbarbereichen mit einer Blendenanordnung überflüssig macht.

[0007] Anordnungen, die das Auflösungsvermögen eines konfokalen Rastermikroskops ist unter anderem durch die Intensitätsverteilung und die räumliche Ausdehnung des Fokus des Anregungslichtstrahls gegeben. Eine Anordnung zur Steigerung des Auflösungsvermögens für Fluoreszenzanwendungen ist aus der PCT/D/E/95/0124 bekannt. Hierbei werden die lateralen Randbereiche des Fokusvolumens des Anregungslichtstrahls mit einem Lichtstrahl einer anderen Wellenlänge, dem sog. Stimulationslichtstrahl, der von einem zweiten Laser emittiert wird, beleuchtet, um dort die vom Licht des ersten Lasers angeregten Probenbereiche stimuliert in den Grundzustand zurück zu bringen. Detektiert wird dann nur das spontan emittierte Licht aus den nicht vom zweiten Laser beleuchteten Bereichen, so daß insgesamt eine Auflösungsverbesserung erreicht wird. Für dieses Verfahren hat sich die Bezeichnung STED (Stimulated Emission Depletion) eingebürgert.

[0008] Eine neue Entwicklung hat gezeigt, daß man gleichzeitig sowohl lateral, als auch axial eine Auflösungsverbesserung erzielen kann, wenn es gelingt, den Fokus des Stimulationslichtstrahles innen hohl zu machen. Hierzu wird in den Strahlengang des Stimulationslichtstrahles eine runde  $\lambda/2$ -Platte, die in ihrem Durchmesser kleiner als der Strahldurchmesser ist und folglich überleuchtet wird, eingebracht.

[0009] Mikroskope zur STED-Mikroskopie sind sehr aufwendig und schwer justierbar, da der Fokus des Anregungslichtstrahls stets mit dem Fokus eines Stimulationslichtstrahls in fester räumlicher Beziehung stehen muß. Ganz besonders schwierig gestaltet sich dieses Problem bei strahlenscannenden Systemen, da bei diesen Systemen die Fokusse des Anregungslichtstrahls und des Detektionslichtstrahles simultan und zueinander ortsfest über bzw. durch die Probe geführt werden müssen.

[0010] Scannmikroskope zur STED-Mikroskopie auf einer optischen Bank realisiert sehr platzraubend und aufgrund ihrer Größe sehr schwierig gegen äußere Einflüsse, wie mechanische Vibrationen oder Temperaturschwankungen der Umgebung schützbär. Aus diesem Grund wurden bislang auch nur objektscannende Systeme realisiert. Aufgrund der Komplexität sind Scannmikroskope zur STED-Mikroskopie durch Nachrüsten herkömmlicher Scannmikroskope nicht umsetzbar.

[0011] Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Scannmikroskop zum optischen Messen eines Probenpunktes einer Probe mit hoher Ortsauflösung anzugeben, das einfach, insbesondere auch durch Nachrüsten oder Umrüsten eines herkömmlichen Scannmikroskops, realisierbar ist.

[0012] Die Aufgabe wird durch ein Scannmikroskop gelöst, das die Merkmale des kennzeichnenden Teils des Anspruchs 1 aufweist.

[0013] Ferner ist es Aufgabe der Erfindung ein Modul zur Formung eines Stimulationslichtstrahles anzugeben, das einfach die beschriebenen Probleme bei der Realisierung eines Scannmikroskops zum optischen Messen eines Probenpunktes einer Probe mit hoher Ortsauflösung löst.

[0014] Die Aufgabe wird durch ein Modul gelöst, das die Merkmale des kennzeichnenden Teils des Anspruchs 1 aufweist.

[0015] Die Erfindung hat den Vorteil, daß der Aufwand zur Realisierung eines höchstauflösenden Scannmikroskops durch Zusammenfassung wesentlicher den Stimulationslichtstrahl formender optischer Elemente zu einem Modul erheblich reduziert wird.

[0016] Das Modul kann neben den optischen Elementen zur Formung des Stimulationslichtstrahles auch Elemente zur Strahlführung, Strahlaufweitung oder Fokussierung beinhalten. Alle optischen Elemente innerhalb des Moduls sind zueinander justiert und das gesamte Modul weist eine Justiervorrichtung auf, die eine einfache Positionierung innerhalb des Strahlenganges eines Scannmikroskops ermöglicht. Hierdurch wird der Gesamtjustieraufwand erheblich reduziert.

[0017] Ein optisches Element zur Formung des Stimulationslichtstrahles kann eine Verzögerungsplatte, vorzugsweise eine  $\lambda/2$ -Platte sein, die von einem Teil des Stimulationslichtstrahles durchstrahlt wird. Auch andere Elemente, wie beispielsweise LCD-Elemente sind zur Formung des Fokus des Stimulationslichtstrahles in der Probe einsetzbar. LCD-Elemente haben den Vorteil, daß die LCD-Rasterelemente elektronisch einzeln ansprechbar sind und die Form des Fokus des Stimulationslichtstrahles den aktuellen Abtastbedingungen angepaßt werden kann. Es ist insbesondere möglich, die Form des Fokus während des Abtastvorganges bzw. während des Scannens zu verändern.

[0018] In ganz besonders vorteilhafter Weise werden die formenden Elemente derart angeordnet bzw. angesteuert, daß der Fokus des Stimulationslichtstrahles in der Probe innen hohl ist, da so eine Auflösungssteigerung in allen Raumrichtungen möglich ist.

[0019] Besonders stabil ist es, das Modul mit einer Grundplatte auszurüsten, auf der die optischen Elemente montiert werden. Die Grundplatte weist vorzugsweise einen kleinen thermischen Ausdehnungskoeffizient auf. Es ist auch möglich die Grundplatte (oder das gesamte Modul) aktiv zu temperieren. Hierzu kann ein elektrischer Regelkreis mit einem Peltierelement vorgesehen sein.

[0020] Ganz besonders günstig ist es, das Scannmikroskop mit Anschlagflächen zu versehen, die eine genaue Arbeitsposition des Moduls definieren, in der das Modul sicher fixiert ist. Im Idealfall ist dann keine weitere Justierung des Moduls nötig. In besonders vorteilhafter Weise sind Bajonettanschlüsse zur Positionierung und Fixierung des Moduls vorgesehen.

[0021] Zum Schutz vor einer äußeren Einwirkung weist das Modul ein Gehäuse auf. Das Gehäuse kann staubdicht ausgeführt sein.

[0022] In ganz besonders vorteilhafter Weise ist das Modul an ein herkömmliches Scannmikroskop adaptierbar, so daß ein Zugang zur höchstauflösenden Scannmikroskopie durch einfaches Nachrüsten ermöglicht ist. Auch die Verwendung des Scannmikroskops in herkömmlicher Weise bleibt unbenommen, da das Modul ohne großen Aufwand entfernbar ist.

[0023] Das Modul beinhaltet in einer besonderen Ausgestaltung die Lichtquelle, insbesondere den Teil der Lichtquelle, die den Stimulationslichtstrahl erzeugt. Als Lichtquelle werden hauptsächlich Laser insbesondere Puls laser verwendet. Hier sind insbesondere Diodenlaser, Festkörperlaser, Farbstofflaser und Gaslaser einsetzbar. Auch die Verwendung einer Lichtquelle die Photonic-Band-Gap-Material beinhaltet ist möglich. Diese kann beispielsweise aus einem Puls laser bestehen, dem ein Lichtleit element oder eine Lichtleitfaser aus Photonic-Band-Gap-Material nachgeordnet ist.

[0024] Das Stimulationslicht kann auch mit einer Lichtleitfaser von einer externen Lichtquelle zum Modul trans-

portiert werden. Zur Auskoppelung des Lichtes aus der Lichtleitfaser weist das Modul eine Koppeloptik auf. Ganz besonders vorteilhaft ist es in diesem Zusammenhang, das Modul mit genormten Lichtleitfasersteckern bzw. Muffen zu versehen.

[0025] Das Scannmikroskop kann insbesondere auch als konfokales Scannmikroskop ausgestaltet sein.

[0026] In der Zeichnung ist der Erfindungsgegenstand schematisch dargestellt und wird anhand der Figuren nachfolgend beschrieben. Dabei zeigt:

[0027] Fig. 1 eine erfindungsgemäße Scannmikroskop.

[0028] Fig. 2 ein weiteres erfindungsgemäßes Scannmikroskop.

[0029] Fig. 3 ein erfindungsgemäßes nachgerüstetes Scannmikroskop und

[0030] Fig. 4 eine schematische Darstellung der Ausbildung einer bestimmten Fokussform.

[0031] Fig. 1 zeigt ein erfindungsgemäßes Scannmikroskop, das als konfokales Scannmikroskop ausgeführt ist.

[0032] Das Scannmikroskop beinhaltet eine Lichtquelle 1, die aus einem ersten Laser 3 zur Erzeugung eines Anregungslichtstrahles 5 und aus einem zweiten Laser 7 zur Erzeugung eines Stimulationslichtstrahles 9. Der erste Laser 3 ist als modenkoppelter Ti:Saphir-Laser ausgeführt, der Pulse mit einer Repetitionsrate von ca. 80 MHz emittiert. Der zweite Laser 7 ist ein optisch parametrischen Oszillator, der von einem anderen gepulst arbeitenden Ti:Saphir-Laser gepumpt wird, der in der Pulsfolge auf den ersten Laser synchronisiert ist. Der Anregungslichtstrahl 5 wird auf ein Beleuchtungspinhole 11 fokussiert und wird anschließend von einem ersten Strahlteiler 13, der als 50:50-Neutralteiler ausgeführt ist, zum Seamodul 15 reflektiert, das einen kardinalisch aufgehängten Scanspiegel 17 beinhaltet, der den Anregungslichtstrahl 5 über die Scanoptik 19, die Optik 21 und durch die Mikroskopoptik 23 hindurch über bzw. durch die Probe 25 führt.

[0033] Der von dem zweiten Laser 7 ausgehende Stimulationslichtstrahl 9 passiert das Modul 27 und wird mit Hilfe des zweiten Strahlteilers 28, der als dichromatischer Strahlteiler ausgeführt ist, mit dem Anregungslichtstrahl 5 vereinigt. Das Modul 27 beinhaltet eine erste Optik 29 zur Aufweitung des Stimulationslichtstrahles 9, eine Verzögerungsplatte 31, die als  $\lambda/2$ -Platte ausgeführt ist und die so angeordnet ist, daß sie vom mittleren Anteil des Stimulationslichtstrahles 9 durchstrahlt wird, während die äußeren Anteile vorbei gehen, und eine zweite Optik 33 zur Fokussierung. Die Verzögerungsplatte 31 befindet sich in einer zur Fokusebene in der Probe 25 konjugierten Fourierebene. Sie erzeugt einen innen hohlen Fokus (siehe Fig. 4). Sie fungiert in dieser Ausführungsvariante als Mittel zur Beeinflussung der Form des Fokus 46. Das Modul 27 weist ein thermisch isolierendes, staubschützendes Gehäuse 34 auf und ist mit Hilfe der Justier Vorrichtungen 35, 36 justierbar.

[0034] Das von der Probe 25 ausgehende Detektionslicht 37 gelangt durch die Mikroskopoptik 23 hindurch und über die Scanoptik 19, die Optik 21 und über das Seamodul 15 zum ersten Strahlteiler 13, passiert diesen und das folgende Detektionspinhole 39 und gelangt schließlich zum Detektor 41, der als Photomultiplier ausgeführt ist. Im Detektor 39 werden elektrische, zur Leistung des vom Objekt ausgehenden Detektionslichtes 37 proportionale Detektionssignale erzeugt.

[0035] Die Probe wird schichtweise abgetastet, um aus den Detektionssignalen ein dreidimensionales Bild der Probe zu erzeugen.

[0036] Die Anregung der Probe erfolgt in diesem Ausführungsbeispiel durch Zweiphotonenanregung. Der zeitliche Abstand der Pulse des Anregungslichtstrahles und des Sti-

mulationslichtstrahles ist kürzer gewählt, als die mittlere Lebensdauer des angeregten Zustandes der Probe.

[0037] Fig. 2 zeigt schematisch ein Seannmikroskop mit einem Modul 43, das zum Schutz vor Staub und Verschmutzung ein Gehäuse 45 aufweist. Das Modul beinhaltet einen zweiten Laser 7, der den Stimulationslichtstrahl 9 erzeugt. [0038] In dieser erfindungsgemäßen Ausgestaltung wird ein LCD-Element 47 zur Formung des Fokus des Stimulationslichtstrahls verwendet. Das von zweiten Laser 7 emittierte Licht gelangt über einen Strahlteilerwürfel 49 zu einer Aufweitungsoptik 51, um anschließend auf das LCD-Element 47 zu treffen. Das LCD-Element 47 fungiert in dieser Ausführungsvariante als Mittel zur Beeinflussung der Form des Fokus 46. Dort können pixelweise die Phase einzelner Anteile des auftretenden Anregungslichtstrahls um  $\lambda/4$  verzögert werden. Der durchgetretene Stimulationslichtstrahl 9 wird von einem Spiegel 53 reflektiert und die bereits beim ersten Durchlaufen verzögerten Anteile erfahren eine weitere Phasenverzögerung beim rückwärtigen Durchlaufen des LCD-Elements 47. Anschließend passiert der Stimulationslichtstrahl 9 den Strahlteilerwürfel 49 und wird am zweiten Strahlteiler 28 mit dem Anregungslichtstrahl vereinigt. Da jedes einzelne Pixel direkt angesteuert werden kann ist diese Anordnung sehr flexibel und gestattet auch Veränderungen während des Betriebs, insbesondere während des Abtastvorganges.

[0039] Das Seannmikroskop weist zwei Anschlagenelemente 55, 57 auf, die eine Arbeitsposition des Moduls definieren. Das Modul ist einfach in dieser Arbeitsposition positionierbar und wird von nicht gezeigten Andruckelementen, die als Blattfedern ausgeführt sind, gegen die Anschlagenelemente gedrückt und in der Arbeitsposition gehalten.

[0040] Fig. 3 zeigt ein konfokales Seannmikroskop 59 mit einem Stativegehäuse 61, bei dem durch Nachrüsten mit dem Modul 63 ein Zugang zur höchstauflösenden Seannmikroskopie geschaffen ist. Das Modul 63 weist ein staublichtes Gehäuse 65 mit einem Bajonettanschluss 67 auf. Das Modul 63 beinhaltet, wie das bereits in Fig. 1 beschriebene Modul 27, eine erste Optik 29 zur Aufweitung des Stimulationslichtstrahles 9, eine Verzögerungsplatte 31, die als  $\lambda/2$ -Platte ausgeführt ist und die so angeordnet ist, daß sie vom mittleren Anteil des Stimulationslichtstrahles 9 durchstrahlt wird, während die äußeren Anteile vorbei gehen, und eine zweite Optik 33 zur Fokussierung. Die  $\lambda/2$ -Platte 31 befindet sich in einer zur Fokusebene in der Probe 25 konjugierten Fourierebene. Sie erzeugt einen innen hohlen Fokus. Das Modul 63 beherbergt ferner einen Laser 7, der den Stimulationslichtstrahl 9 erzeugt und als Diodenlaser ausgeführt ist. Alle Elemente innerhalb des Moduls 63 sind derart justiert, daß nach dem Anflanschen an das Stativegehäuse 61 keine weitere Justierung erforderlich ist.

[0041] Innerhalb des konfokalen Seannmikroskops 59 verlaufen die Strahlengänge analog zu den in Fig. 1 beschriebenen Strahlengängen. Der Stimulationslichtstrahl 9 wird am zweiten Strahlteiler 28 mit dem Anregungslichtstrahl 5 vereinigt, der von dem Laser 3 erzeugt wurde. Der Anregungslichtstrahl 5 erreicht zusammen mit dem Stimulationslichtstrahl 9 den ersten Strahlteiler 13, der die Lichtstrahlen zum kardianisch aufgehängten Scanspiegel 17 reflektiert. Von dort aus gelangen der Stimulationslichtstrahl und der Anregungslichtstrahl über die Scanoptik 19, die Optik 21 und durch die Mikroskopoptik 23 hindurch zur Probe 25, die auf einem Mikroskopisch 69 angeordnet ist.

[0042] Das gezeigte konfokale Seannmikroskop 59 weist einen Descan-Detektor 71 und einen Non-Descan-Detektor 73 auf. Insbesondere bei der Anregung der Probe 25 über einen Mehrphotonenprozeß ist die Verwendung des Non-Descan-Detektor 73 von besonderem Interesse. In der Descan-

Arbeitsweise gelangt das Detektionslicht 37 durch die Mikroskopoptik 23 hindurch und über die Optik 21, die Scanoptik 19 und über das den Scanspiegel 17 zum ersten Strahlteiler 13, passiert diesen und das folgende Detektionspinhole 39 und gelangt schließlich zum Descan-Detektor 71, der als Photomultiplier ausgeführt ist. In der Non-Descan-Arbeitsweise wird das Detektionslicht 37 von einem Kondensor 75 gebündelt und gelangt über den Spiegel 77 zum Non-Descan-Detektor 73. Auf ein Detektionspinhole kann in der Non-Descan-Arbeitsweise verzichtet werden.

[0043] Fig. 4 zeigt eine schematische Darstellung der Ausbildung einer bestimmten Fokusform des Stimulationslichtstrahles 9 und verdeutlicht die räumliche Lage des Anregungslichtstrahles 5 und des Stimulationslichtstrahles 9 innerhalb oder an der Oberfläche der zu untersuchenden Probe 25. Der Stimulationslichtstrahl 9 besitzt einen größeren Strahldurchmesser als der Anregungslichtstrahl 5, so dass der Anregungslichtstrahl 5 von dem Stimulationslichtstrahl 9 im Fokusbereich vollständig umschlossen ist. Der Stimulationslichtstrahl 9 weist einen innen hohlen Fokus auf. Durch die Überlappung des Anregungslichtstrahles 5 und des Stimulationslichtstrahl 9 wird im Fokusbereich ein 3-dimensionaler Überlappungsbereich 79 definiert, der in Fig. 4 als schraffierte Fläche dargestellt ist. Der Bereich der im Fokusbereich Anregungslichtstrahles 5 und innerhalb des hohlen Anteils des Stimulationslichtstrahles 9 liegt, definiert das Emissionsvolumen 81.

[0044] Die Erfindung wurde in Bezug auf eine besondere Ausführungsform beschrieben. Es ist jedoch selbstverständlich, dass Änderungen und Abwandlungen durchgeführt werden können, ohne dabei den Schutzbereich der nachstehenden Ansprüche zu verlassen.

#### Bezugszeichenliste

- 1 Lichtquelle
- 3 erster Laser
- 5 Anregungslichtstrahl
- 7 zweiter Laser
- 9 Stimulationslichtstrahl
- 11 Beleuchtungspinhole
- 13 erster Strahlteiler
- 15 Scanmodul
- 17 Scanspiegel
- 19 Scanoptik
- 21 Optik
- 23 Mikroskopoptik
- 25 Probe
- 27 Modul
- 28 zweiter Strahlteiler
- 29 erste Optik
- 31 Verzögerungsplatte
- 33 zweite Optik
- 34 Gehäuse
- 35 Justiervorrichtung
- 36 Justiervorrichtung
- 37 Detektionslicht
- 39 Detektionspinhole
- 41 Detektor
- 43 Modul
- 45 Gehäuse
- 46 Mittel zur Beeinflussung der Form des Fokus
- 47 LCD-Element
- 49 Strahlteilerwürfel
- 51 Aufweitungsoptik
- 53 Spiegel
- 55 Anschlagenelement
- 57 Anschlagenelement

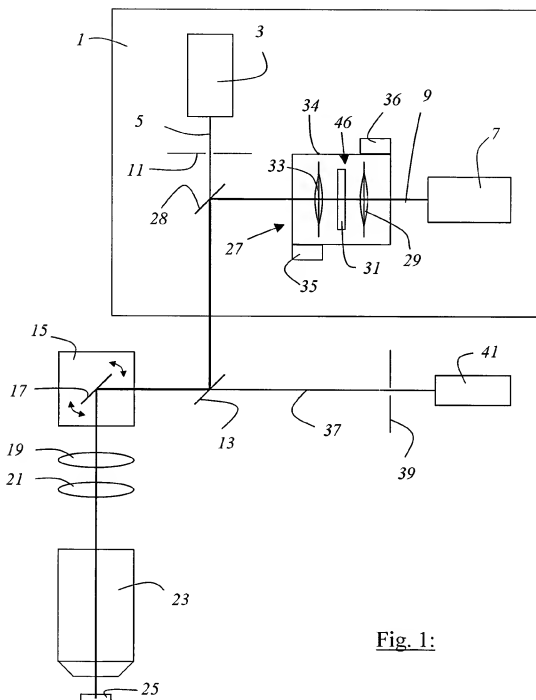
59 Scannmikroskop  
 61 Stativgehäuse  
 63 Modul  
 65 Gehäuse  
 67 Bajonettanschluß  
 69 Mikroskoptisch  
 71 Descan-Detektor  
 73 Non-Descan-Detektor  
 75 Kondensor  
 77 Spiegel  
 79 Überlappungsbereich  
 81 Emissionsvolumen

# Patentsprüche

1. Ein Scannmikroskop zum optischen Messen eines Probenpunktes einer Probe (25) mit hoher Ortsauflösung umfasst eine Lichtquelle (1), die einen Anregungslichtstrahl (5) aussendet, der zum Anregen eines Energiezustandes in der Probe (25) geeignet ist, mindestens einen Detektor (41, 71, 73) zum Nachweis des von der Probe (25) ausgehenden Emissionslichts, und einen ebenfalls von der Lichtquelle ausgehenden Stimulationslichtstrahl (9) zum Erzeugen stimulierter Emission in der von dem Anregungslichtstrahl (5) angeregten Probe (25) in dem Probenpunkt, wobei der Anregungslichtstrahl (5) und der Stimulationslichtstrahl (9) derart auf die Probe gerichtet sind, daß sich ihre Intensitätsverteilungen in einem Fokalebereich zumindest teilweise decken, **dadurch gekennzeichnet**, daß mehrere optische Elemente vorgesehen sind, die den Stimulationslichtstrahl (9) formen, wobei die optischen Elemente zu mindestens einem Modul (27, 43, 63) zusammengefasst sind, das im Strahlengang des Scannmikroskops positionierbar ist.
2. Scannmikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Modul (27, 43, 63) ein Gehäuse (34, 45, 65) aufweist.
3. Scannmikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass Modul (27, 43, 63) eine Justiervorrichtung (35, 36) zur Justierung des Moduls (27, 43, 63) in Bezug auf das Scannmikroskop aufweist.
4. Scannmikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Anschlagenelemente (55, 57) vorgesehen sind, die eine Arbeitsposition des Moduls (27, 43, 63) bezüglich des Scannmikroskops definieren.
5. Scannmikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Modul (27, 43, 63) einen Bajonettanschluß (67) zum Scannmikroskop aufweist.
6. Scannmikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Modul (27, 43, 63) zumindest einen Teil der Lichtquelle (1) beinhaltet.
7. Scannmikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Modul (27, 43, 63) Optiken (29, 33) zur Aufweitung oder zur Fokussierung des Stimulationslichtstrahl (9) beinhaltet.
8. Scannmikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Modul (27, 43, 63) mindestens eine Verzögerungsplatte (31) beinhaltet.
9. Scannmikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Modul (27, 43, 63) Mittel zur Beeinflussung der Form des Fokus (46) des Stimulationslichtstrahles in der Fokalebene beinhaltet.
10. Scannmikroskop nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Mittel zur Beeinflussung der Form des Fokus (46) des Stimulationslichtstrahles (9) einen innen hohlen Fokus erzeugen.
11. Modul (27, 43, 63) zur Formung eines Stimulationslichtstrahles zum Erzeugen stimulierter Emission einer angeregten Probe (25), dadurch gekennzeichnet, mehrere optische Elemente vorgesehen sind, die den Stimulationslichtstrahl (9) formen, wobei die optischen Elemente zu mindestens einem Modul (27, 43, 63) zusammengefasst sind, das im Strahlengang des Scannmikroskops positionierbar ist.
12. Modul (27, 43, 63) nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Modul ein Gehäuse (34, 45, 65) aufweist.
13. Modul (27, 43, 63) nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Modul einen Bajonettanschluß aufweist.
14. Modul (27, 43, 63) nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass bezüglich des Strahlenganges des Scannmikroskops justierbar ist.
15. Modul (27, 43, 63) nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Modul (27, 43, 63) eine Lichtquelle beinhaltet.
16. Modul (27, 43, 63) nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Lichtquelle (1) ein Laser (3, 7) ist.
17. Modul (27, 43, 63) nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Modul Optiken (29, 33) zur Aufweitung oder zur Fokussierung des Stimulationslichtstrahl beinhaltet.
18. Modul (27, 43, 63) nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Modul mindestens eine Verzögerungsplatte (31) beinhaltet.
19. Modul (27, 43, 63) nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Modul Mittel zur Beeinflussung der Form des Fokus (46) des Stimulationslichtstrahles in der Fokalebene beinhaltet.
20. Modul (27, 43, 63) nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Mittel zur Beeinflussung der Form des Fokus (46) des Stimulationslichtstrahles (9) in der Fokalebene einen innen hohlen Fokus erzeugen.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

Fig. 1:



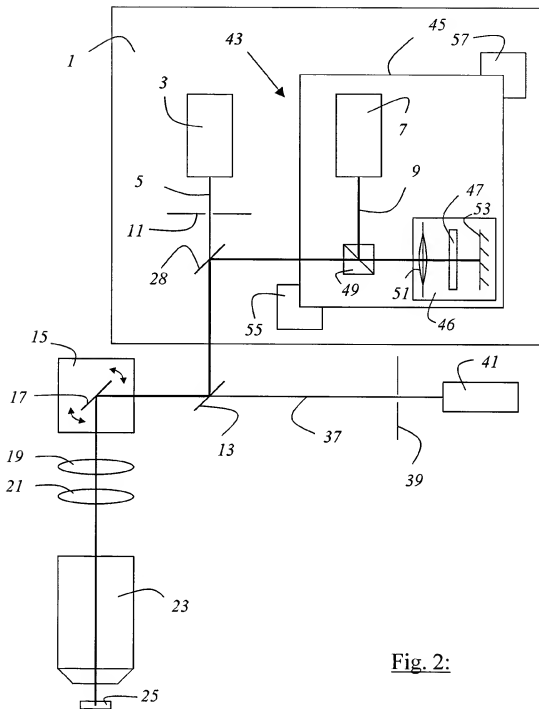
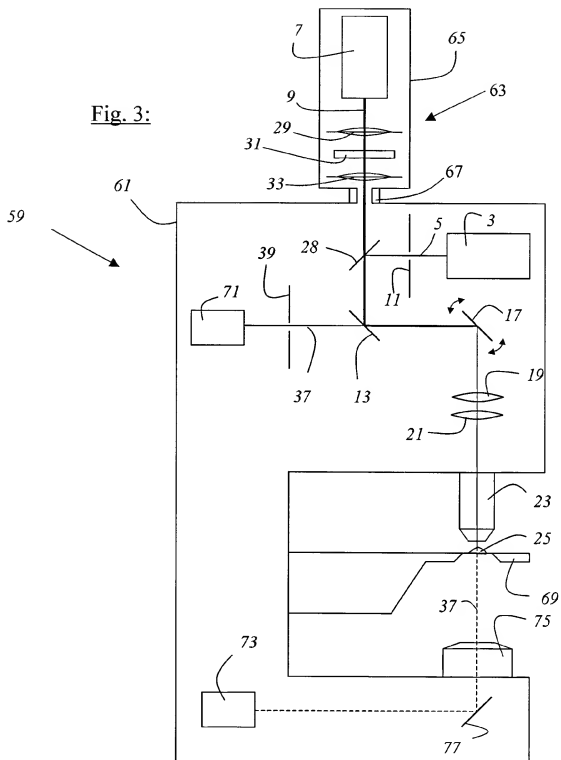


Fig. 2:

Fig. 3:



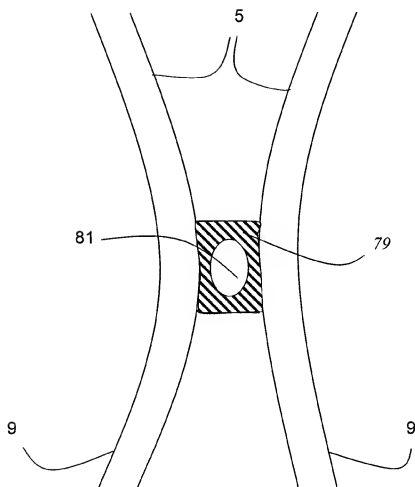


Fig. 4: